

26th German Conference on weed Biology and Weed Control, March 11-13, 2014, Braunschweig, Germany

Vererbung der Herbizidresistenz gegen ALS-Inhibitoren bei *Tripleurospermum perforatum*

*Inheritance of ALS herbicide resistance in *Tripleurospermum perforatum**

Lena Ulber

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12,
38104 Braunschweig
lena.ulber@jki.bund.de



DOI 10.5073/jka.2014.443.036

Zusammenfassung

In einem Resistenz-Monitoring, das im Jahr 2011 vom JKI und der Firma EpiGene durchgeführt wurde, wurden Biotypen von *Tripleurospermum perforatum* mit einer Resistenz gegen den Wirkstoff Tribenuron (ALS-Inhibitor) detektiert. Im Rahmen des Monitorings wurden die entsprechenden Biotypen hinsichtlich ihrer Resistenz- und Kreuzresistenzprofile sowie des molekularen Hintergrundes der Resistenz analysiert. Bei der Art *T. perforatum* lagen bisher keine Informationen zu der Vererbung der Resistenzeigenschaften und der Möglichkeit der Verbreitung der Resistenz über Pollentransfer von resistenten zu sensiblen Pflanzen vor. Da es sich bei *Tripleurospermum perforatum* um eine von Insekten bestäubte Art handelt, sollte insbesondere die Übertragung der Resistenzeigenschaften über Pollentransfer untersucht werden.

Mit diesem Ziel wurde im Jahr 2012 ein Halbfreilandversuch durchgeführt. Zehn resistente Pflanzen einer charakterisierten resistenten Population wurden mit jeweils einer Pflanze einer sensiblen Population gekreuzt. Die aus diesen Kreuzungen entstammenden F1-Populationen wurden in Dosis-Wirkungs-Versuchen hinsichtlich ihrer Herbizidsensitivität untersucht und mit der resistenten und sensiblen Ursprungspopulation verglichen.

Stichwörter: Pollentransfer, Resistenz-Monitoring

Abstract

In a resistance survey that was conducted in 2011 by the Julius Kühn-Institut and EpiGene, several biotypes of *Tripleurospermum perforatum* with resistance to the active substance tribenuron (ALS inhibitor) were identified. During this survey, the resistant biotypes were characterised regarding their resistance and cross-resistance pattern as well as the molecular basis of resistance. However, for *Tripleurospermum perforatum* no information was available on the inheritance of the resistance trait and the possibility of a transfer of the resistance trait from resistant to sensitive plants via pollen. As the species *T. perforatum* is known to be insect pollinated, a transfer of the resistance trait via the pollen was assumed.

To test this hypothesis, a semi-field trial was conducted in 2012. Ten randomly chosen plants from a known resistant biotype (R) were pair-crossed to one plant of a susceptible reference population (S) to produce a total of 10 F1 pair crosses. Plants grown from the F1 seeds were then analyzed for their herbicide sensitivity using dose-response trials and the sensitivity of the F1 generation was compared to sensitivity level of the R and S parent biotypes.

Keywords: Pollen transfer, resistance monitoring

Einleitung

Der verstärkte Einsatz von ALS-Inhibitoren gegen dikotyle Unkräuter hat in Deutschland und anderen europäischen Ländern zu der Selektion von herbizidresistenten Populationen von *Tripleurospermum perforatum* (Mérat) Lainz (Geruchlose Kamille) geführt. In den Jahren 2008 und 2009 wurden in Norddeutschland erstmals Populationen mit einer Resistenz gegen Tribenuron beobachtet (HEAP, 2011). In den folgenden Jahren wurden von Landwirten und Beratern zahlreiche weitere ALS-resistente Populationen, vor allem mit Resistenz gegen Tribenuron, gemeldet.

Die Vererbung der Herbizidresistenz gegen ALS-Inhibitoren wurde in zahlreichen diploiden Unkrautarten untersucht; dabei wurde die Vererbung fast ausschließlich durch dominante oder semi-dominante Allele kontrolliert. Da die Informationen für das ALS-Enzym durch den Zellkern kodiert werden, können resistente Allele über Pollen oder Samen vererbt werden (TRANSEL und

WRIGHT, 2002). Während die Ausbreitung durch Samen (z.B. über Erntemaschinen) auch über weitere Distanzen erfolgen kann, ist die Verbreitung der Resistenzeigenschaften über Pollen von der Art der Bestäubung der Pflanzenart abhängig. Da es sich bei *T. perforatum* um eine durch Insekten bestäubte Art handelt, ist eine Ausbreitung über den Pollen, in Abhängig von der Flugdistanz der bestäubenden Insekten, auch über längere Distanz denkbar. Während die Verbreitung der Herbizidresistenz bei dikotylen Arten über Samen bereits gut dokumentiert ist, liegen kaum Ergebnisse zur Vererbung der Resistenz über Pollentransfer vor. Daher sollte in dieser Arbeit die potentielle Verbreitung der Herbizidresistenz bei *T. perforatum* über Pollentransfer untersucht werden.

Material und Methoden

Herkunft der untersuchten Populationen

In 2011 wurde ein Monitoring zur Resistenz gegen ALS-Inhibitoren bei *T. perforatum* durchgeführt. Dabei wurden von 80 Ackerflächen (Winterweizen, Wintergerste und Winterraps in Deutschland) Samenproben entnommen (ULBER *et al.*, 2012). Von den insgesamt 80 untersuchten Populationen wiesen nach einer Behandlung mit der zugelassenen Aufwandmenge von Tribenuron 8 Populationen (10 %) resistente Pflanzen auf.

Eine dieser acht *T. perforatum*-Populationen, die eine besonders hohe Frequenz an resistenten Pflanzen zeigte, wurde für diese Untersuchung verwendet und nachfolgend als R-Population bezeichnet. Die betreffende Population stammte von einem Schlag in Norddeutschland, auf dem eine Minderwirkung des eingesetzten ALS-Inhibitors beobachtet wurde. Die Herbizidhistorie des Schlages zeigte eine jährliche Applikation von ALS-Inhibitoren seit mindestens acht Jahren. Zudem wurde in dieser Untersuchung eine interne sensitive Referenzpopulation (S-Population) verwendet.

Kreuzung der sensitiven und resistenten Population

Die Samen der beiden zu untersuchenden Populationen wurden auf Filterpapier in Petri-Schalen vorgekeimt. Dabei wurde die Anzahl der zu verwendenden Samen an die jeweils vorher determinierte Keimfähigkeit angepasst. Die Petri-Schalen wurden in einem Klimaschrank bei konstant 20 °C mit einer Photoperiode von 16 Stunden für 9 Tage aufgestellt bis die gekeimten Pflanzen eine pikierfähige Größe im Keimblattstadium erreicht hatten. Ein Keimling jeder Population mit einer annähernd gleichen Pflanzengröße wurde jeweils in einen Topf pikiert (zehn Töpfe/Wiederholungen pro Population), der mit einem Standard-Biotest-Boden (50 % Sand, 38 % schluffiger Lehm, 12 % Ton) gefüllt war. Die Töpfe wurden bis kurz vor der Blüte in einem Halb-Freilandareal aufgestellt und regelmäßig bewässert. Vor dem Beginn der Blüte wurden die Pflanzen auf dem JKI-Freilandgelände zufällig platziert aufgestellt, um eine Bestäubung durch Insekten zu ermöglichen. Dabei wurde zur gegenseitigen Bestäubung jeweils eine Pflanze der resistenten Population (R) neben einer Pflanze der sensitiven Referenzpopulation (S) aufgestellt. So ergaben sich zehn aus jeweils einer S- und R-Pflanze bestehende paarweise Kreuzungen. Die Pflanzenpaare wurden mit einem Mindestabstand von 500 m zueinander aufgestellt. Die Samen jeder Pflanze wurden nach vollständiger Samenreife separat geerntet und bei Raumtemperatur getrocknet. So ergaben sich insgesamt 20 F1-Populationen; 10 Populationen, die von der R-Population abstammten (R-F1), und 10 Populationen, die von der sensitiven S-Population abstammten (S-F1).

Bestimmung der Sensitivität der F1-Populationen

Um die Sensitivität der F1-Populationen zu untersuchen, wurden die Samen der 20 F1-Populationen wie oben beschrieben in Petri-Schalen vorgekeimt. Zehn Pflanzen jeder Population wurden in separate Töpfe pikiert und im 3-4-Blattstadium mit dem ALS-Inhibitor Tribenuron-Methyl (Pointer SX, 500 g a.i./kg, DuPont) in der zugelassenen Aufwandmenge von 30 g ai/ha behandelt. Die Pflanzen wurden in einer automatischen Applikationsanlage behandelt (Firma Schachtner), die mit einer Einzeldüse (TeeJet 8002EVS, TeeJet Technologies GmbH, Ludwigsburg,

Germany) ausgestattet war. Dabei wurde das Herbizid mit einer Wasseraufwandmenge von 300 L/ha bei einem Druck von 210 kPa ausgebracht. Die Sensitivität der Pflanzen gegenüber Tribenuron-Methyl wurde 21 Tage nach der Behandlung festgestellt, indem die oberirdische Frischmasse der einzelnen Pflanzen abgeschnitten und gewogen wurde. Statistische Unterschiede zwischen den Populationen wurden anhand des Mann-Whitney-Tests untersucht da keine Normalverteilung der Daten vorlag.

Für jeweils drei R-F1 (R_F1_1 bis R_F1_3) und S-F1 (S_F1_1 bis S_F1_3)-Populationen wurden zudem Dosis-Wirkungs-Experimente mit Tribenuron-Methyl durchgeführt. Dabei wurden die beiden Ursprungspopulationen (S und R) zum statistischen Vergleich mitgeführt. Die Keimung der Samen erfolgte wie oben beschrieben. Jeweils 4 Pflanzen wurden in einen Topf pikiert, wobei für jede Population drei Töpfe als Wiederholungen angelegt wurden. Die Pflanzen wurden im 3-4-Blattstadium mit den folgenden Dosierungen von Tribenuron-Methyl behandelt: 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120, 240, und 480 g ai/ha. Dabei wurde das Herbizid wie oben beschrieben appliziert. Die Sensitivität der Pflanzen gegenüber Tribenuron wurde 21 Tage nach der Behandlung durch die Bestimmung der oberirdischen Pflanzenbiomasse pro Topf festgestellt. Auf Basis der daraus entstehenden Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für die einzelnen Populationen ED₅₀-Werte sowie die daraus abgeleiteten Sensitivitätsindices (SI) berechnet. Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die Berechnung der ED₅₀-Werte erfolgten mit dem Statistikprogramm R.

Ergebnisse

Nach der Applikation der zugelassenen Aufwandmenge von Tribenuron (30 g/ha) zeigte sich bei den S-F1- und R-F1-Populationen eine hohe Variabilität hinsichtlich der Wirksamkeit. Insgesamt war bei den von der resistenten Ursprungspopulation abstammenden Pflanzen (R-F1) eine geringere Wirksamkeit des Tribenurons als bei den von der sensiblen Population abstammenden Pflanzen (S-F1) zu erkennen (Abb. 1). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit von Tribenuron auf die Pflanzen der R-F1- bzw. S-F1-Populationen festgestellt werden ($p = 0.423$). Im Vergleich zu der sensiblen Ursprungspopulation (S) war die Wirksamkeit des applizierten Tribenurons aber sowohl bei den Pflanzen der S-F1- als auch bei denen der R-F1-Population signifikant geringer ($p > 0.005$).

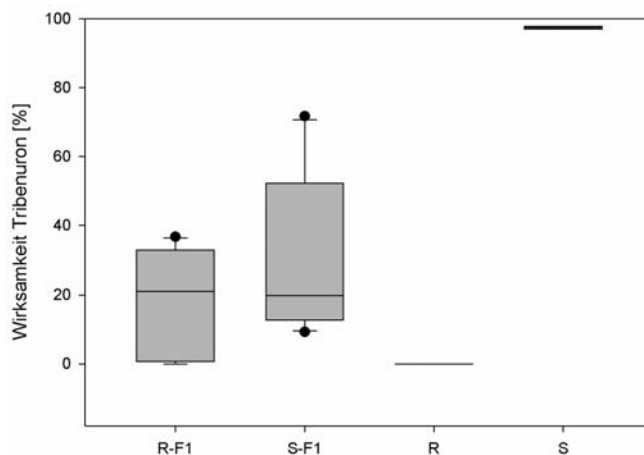


Abb. 1 Wirksamkeit (prozentuale Reduktion der oberirdischen Biomasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) von Tribenuron (30 g ai/ha) bei den F1-Populationen (R-F1 und S-f1) sowie der sensiblen (S) und resistenten (R) Ursprungspopulation 21 Tage nach der Applikation.

Fig. 1 Efficacy (% reduction in leaf biomass compared to untreated control) of tribenuron (30 g ai/ha) on F1 populations (R-F1 and S-f1) as well as sensitive (S) and resistant (R) parent populations 21 days after treatment.

Bei dem Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven der drei ausgewählten Kreuzungspaare mit den jeweiligen Ursprungspopulationen der S- und R-Populationen zeigte sich, dass sowohl die drei untersuchten S-F1-Populationen als auch die drei R-F1-Populationen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber den applizierten Dosierungen aufwiesen. Die S-Ursprungspopulation (S) reagierte dagegen mit deutlich verminderten Frischmassegewichten auf die jeweils verwendeten Aufwandmengen von Tribenuron. Bei der R-Ursprungspopulation dagegen konnte selbst mit einer maximalen 16-fach erhöhten Aufwandmenge keine deutliche Reaktion des Frischmassegewichtes gegenüber der unbehandelten Kontrolle erreicht werden. Daher konnten für diese Population keine ED₅₀-Werte errechnet werden.

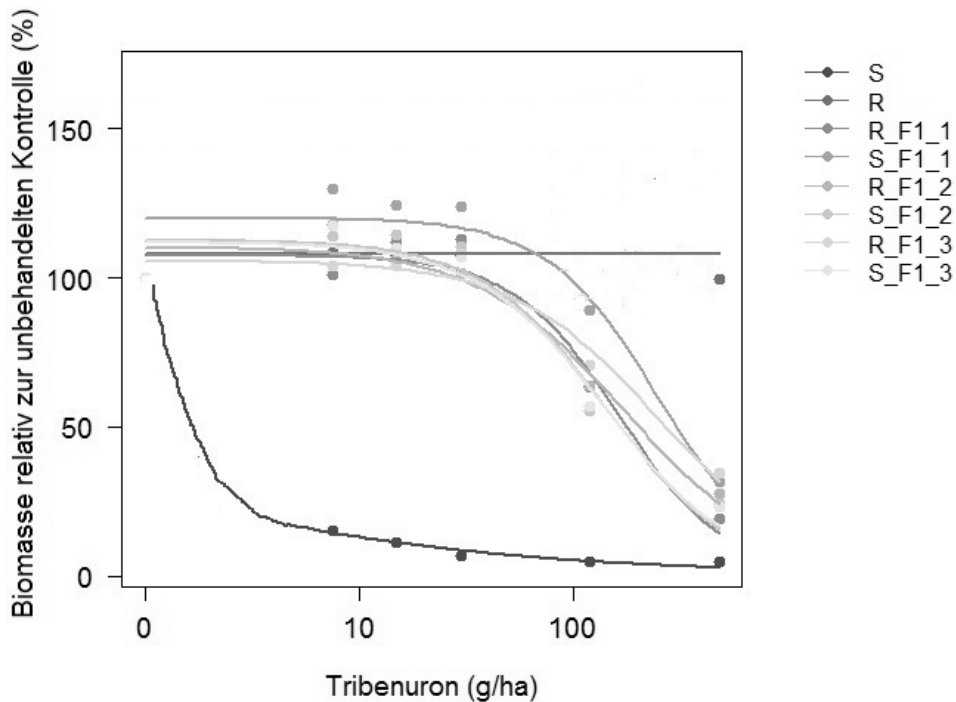


Abb. 2 Dosis-Wirkungs-Kurven der R-F1 (R_F1_1 bis R_F1_3) und S-F1 (S_F1_1 bis S_F1_3)-Populationen sowie der sensitiven (S) und resistenten (R) Ursprungspopulation 21 Tage nach der Applikation mit Tribenuron.

Fig. 2 Dose-response curves of resistant (R_F1_1 to R_F1_3) and sensitive (S_F1_1 to S_F1_3) F1 populations as well as sensitive (S) and resistant (R) parent populations 21 days after treatment with tribenuron.

Die ED₅₀-Werte aller sechs F1-Populationen waren signifikant höher als die der S-Ursprungspopulation (alle $p < 0,005$; Tab. 1). Zwischen den von den sensitiven und resistenten Ursprungspopulationen abstammenden F1-Populationen konnten aber bei allen drei untersuchten Kreuzungspaaren keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund des nicht errechenbaren ED₅₀-Wertes für die R-Ursprungspopulation konnten bei dieser Population keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ED-Werte errechnet werden.

Tab. 1 ED₅₀-Werte, Standardfehler (SE) und Sensitivitätsindices (SI) der untersuchten Populationen nach der Behandlung mit aufsteigenden Dosierungen von Tribenuron.

Tab. 1 ED₅₀ values, standard error (SE) and sensitivity indices of investigated populations after treatment with different dose of tribenuron.

Pop	ED50	SE	SI
R	>480	-	-
R_F1_1	163,92	39,1206	135,19
R_F1_2	174,41	49,6187	143,85
R_F1_3	248,97	72,6232	205,34
S	1,21	0,8346	1
S_F1_1	249,25	54,6484	205,57
S_F1_2	142,23	35,4895	117,30
S_F1_3	142,53	36,0489	117,55

Basierend auf den ED₅₀-Werten zeigten die F1- Populationen im Vergleich zu der sensitiven Ursprungspopulation eine um 117 - 205fach erhöhte Toleranz gegenüber Tribenuron.

Diskussion

Nach der Applikation der vollen zugelassenen Aufwandmenge von Tribenuron zeigten die von der sensitiven Ursprungspopulation (S) abstammenden Pflanzen (S-F1) eine Herbizidreaktion, die deutlich unter der ebenfalls parallel getesteten S-Ursprungspopulation lag (Abb. 1). Daher kann in diesem Fall von einem Transfer der Resistenzeigenschaften von den R- auf die S-Pflanzen während der Kreuzung der Pflanzen ausgegangen werden, der sich auf die Sensitivität der Folgegeneration auswirkte. Die Target-Site-Resistenz gegen ALS-Inhibitoren wird in den meisten Fällen durch ein einzelnes dominantes oder semi-dominantes Allel vererbt, sodass die Resistenzeigenschaft auf die nachfolgende Generation übertragen werden kann (IMAIZUMI *et al.*, 2008). Auch bei der hier verwendeten resistenten Population (R) konnte eine einzelne Mutation an der Position Pro-197-Gln nachgewiesen werden (FELSENSTEIN, Daten nicht veröffentlicht), sodass von einer dominanten bzw. semi-dominanten Vererbung ausgegangen werden kann. Allerdings wurde bei den R-F1-Populationen die Frischmasse durch die Applikation von Tribenuron ebenfalls deutlicher vermindert als bei der R-Ursprungspopulation. So scheint hier die Sensitivität der Nachfolgegeneration gegenüber der Ursprungspopulation erhöht worden sein. Dies widerspricht einem ausschließlich dominanten Vererbungsweg und würde eher auf eine semi-dominante Vererbung hinweisen.

Da es sich bei der Art *T. perforatum* um eine durch Insekten bestäubte Unkrautart handelt (KAY, 1969), kann von einem potentiellen Transfer der Resistenzeigenschaft über den Pollen ausgegangen werden, der zumindest teilweise durch blütenbestäubende Insekten ermöglicht wird. So wurden während der Durchführung des Versuches zahlreiche Bestäuberarten wie Wildbienen und Schwebfliegen an den Floreszenzen der Versuchspflanzen beobachtet. Neben der Übertragung des Pollens durch Insekten kann aber auch eine Übertragung durch Wind nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zeigen die Ausbreitungsmöglichkeit der Herbizidresistenz bei *T. perforatum* über einen Pollentransfer. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die potentielle maximale Distanz einer Übertragung über Pollen festzustellen. So wurde bei der Art *Lolium rigidum* in Australien ein Pollenflug über eine Distanz von 3 km nachgewiesen (BUSI *et al.*, 2008). Bei insektenbestäubten Pflanzenarten kann aber auch von größeren Übertragungsdistanzen ausgegangen werden (MUTHUKUMAR *et al.*, 2013). Da die Art *T. perforatum* zudem eine hohe Anzahl an Samen aufweist, können sich resistente Individuen in einer Population auch über diesen Fortpflanzungsweg durchsetzen.

Danksagung

Die Autorin bedankt sich bei Carmen Wziontek und Renate Verschwele für die engagierte und sorgfältige Durchführung der Versuche.

Literatur

- BUSI, R., Q. YU, R. BARRETT-LENNARD and S. POWLES, 2008: Long distance pollen-mediated flow of herbicide resistance genes in *Lolium rigidum*. *Theor. Appl. Genet.* **117**, 1281–1290.
- HEAP, I., 2011: International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.org.
- IMAIZUMI, T., G. X. WANG and T. TOMINAGA, 2008: Inheritance of sulfonylurea resistance in *Monochoria vaginalis*. *Weed Res.* **48**(5), 448-454.
- KAY, Q. O. N., 1969: The origin and distribution of diploid and tetraploid *Tripleurospermum inodorum* (L.). *Watsonia* **7**(3), 130-141.
- MUTHUKUMAR V., J. K. NORSWORTHY, R. C. SCOTT and T. L. BARBER, 2013: The Spread of Herbicide-Resistant Weeds: What Should Growers Know? Agriculture and Natural Resources. FSA2171.
- TRANIEL, P. J. and T. R. WRIGHT, 2002: Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Sci.* **50**, 700-712.
- ULBER, L., E. SVOBODA, B. JASER, F. FELSENSTEIN und P. ZWERGER, 2012: Deutschlandweites Monitoring zur ALS-Resistenz bei Kamille-Arten. *Julius-Kühn-Archiv* **438**, 318-319.